



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 49 267 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 49 267.6
㉑ Anmeldetag: 28. 12. 95
㉒ Offenlegungstag: 3. 7. 97

⑥ Int. Cl.⁸:
C 07 K 1/30
G 01 N 1/28
G 01 N 33/68
C 12 Q 1/37
C 12 Q 1/26
C 12 N 9/52
C 12 N 9/68
C 12 N 9/70
C 12 N 9/48
C 12 N 9/02

DE 195 49 267 A 1

⑦ Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑧ Erfinder:
Behlke, Joachim, Prof. Dr., 13125 Berlin, DE;
Knespel, Andreas, 16341 Neu-Buch, DE

⑤ Verfahren zur Kristallisation von Proteinen

⑤ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kristallisation von Proteinen insbesondere zur Induktion und Früherkennung von Kristallkeimen in Proteinlösungen.
Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß eine hochgesättigte Proteinlösung hochtourig zentrifugiert wird, die Konzentrationsverteilung des Proteins in der Zentrifugenzelle analysiert und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald Assoziate (Kristallkeime) bestimmter Größe und Konzentration vorliegen.

DE 195 49 267 A 1

DE 195 49 267 A1

keimen in hochgesättigten Proteinlösungen geeignet, indem eine kontinuierliche Erhöhung der Proteinkonzentration bis zur Bildung erster Assoziate erfolgt, die hinsichtlich ihrer Partialkonzentration analysiert werden, woraus die Gleichgewichtskonstanten abgeleitet werden, die freie Energie der Assoziationsvorgänge berechnet und die Zentrifugation abgebrochen wird, sobald die Anlagerung von Monomeren an ein vorhandenes Assoziat Energie freisetzt. Dieser Zustand ist notwendig, damit aus den Keimen Kristalle in einer spontanen Reaktion wachsen. Nach dem Erscheinen stabiler Assoziate wird in absehbarer Zeit (1–2 Tage) die Bildung von Kristallen nachgewiesen. 5

Gemäß der Erfindung werden gegebenenfalls Substanzen mit schwachen "Linker"-Eigenschaften zugesetzt, die überraschend die Bildung von Proteinassoziaten unterstützend initiieren oder Assoziate mit niedrigen Assoziationszahlen stabilisieren. 10

Substanzen mit schwachen "Linker"-Eigenschaften sind dadurch charakterisiert, daß sie eine kovalente und mindestens eine Wasserstoffbrücke zu unterschiedlichen Proteinmolekülen ausbilden können.

Bevorzugt handelt es sich um Pyridoxalphosphat oder entsprechende Verbindungen.

Das Verfahren ist anwendbar für Proteine, die auf Grund ihrer erhöhten Flexibilität oder besonders hohen Domänenbeweglichkeit, — wie Fibrinolytika mit "Kringelstrukturen" — nicht zur Ausbildung von Assoziatstrukturen in der Lage sind, insbesondere für Plasminogen, Plasminogen-Aktivatoren, Streptokinase, und Staphylokinase. 15

Außerdem kann es auch für Membranproteine, die im delipidisierten Zustand aggregieren, ansonsten aber "reaktionsträge" Oberflächen besitzen, die in der Regel aber nicht zur Ausbildung einer geordneten Assoziatstruktur befähigt sind — wie Cytochrom P450 — angewendet werden. Cytochrom P450 katalysiert mannigfaltige Oxygenasereaktionen und wird insbesondere zur Steroidhydroxylierung eingesetzt oder ist an der Synthese des Aldosterons (Bluthochdruck) beteiligt. 20

Es werden erfindungsgemäß die Partialkonzentrationen der einzelnen Molekülspezies (Monomere und Assoziate) von hochkonzentrierten Proteinlösungen in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration, der gewählten Drehzahl und der Zeit analysiert. 25

Diese Daten erlauben Rückschlüsse über die Größe der Kristallkeime und ihre Stabilität.

Damit hat das Verfahren den großen Vorteil, schwer kristallisierbare Proteine in Lösungen zur Assoziatbildung anzuregen, diese frühzeitig zu erkennen und Assoziate mit niedriger Assoziationszahl zu stabilisieren.

Anschließend wird die Erfindung an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert, die die Erfindung jedoch nicht beschränken soll. 30

Material und Methoden

Die Proteine Lysozym und Papain wurden von Boehringer, Mannheim, bzw. Merck, Darmstadt, erhalten.

Die Zentrifugationsexperimente wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge Spinco E (Beckman) unter Verwendung einer Schlierenoptik durchgeführt. 35

Die Sedimentationskoeffizienten des monomeren Proteins wurden zunächst aus der zeitabhängigen Wanderung der Grenzschicht in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt.

$$s = \frac{\ln(r/r_m)}{\omega^2(t-t_0)} \quad (1)$$

mit r als Radialposition (entspricht gewöhnlich dem 50% Wert der Grenzschicht) zur Zeit t und r_m als Meniskuspotion (Zeit t_0) und ω der Winkelgeschwindigkeit. Bei Verwendung des Schlierenoptischen Systems erhält man für die radiale Konzentrations-Verteilung eine Gaußkurve mit den Ordinaten $\frac{1}{r}(dc/dr)$, wobei die Fläche unter der Kurve proportional zur Anfangskonzentration ist. 40

Für eine monodisperse Lösung, die nur eine Species während der zeit-abhängigen Bewegung des Peaks enthält (50% Fraktion) bestimmt man den Sedimentationskoeffizienten gemäß Formel (1). Wenn die Lösung neben den Monomeren auch noch Oligomere wie Dimere, Trimere, Tetramere ect. enthält, wird die Gaußkurve mehr asymmetrisch wegen der etwas schnelleren Bewegung der assoziierten Spezies. Ihre Sedimentationskoeffizienten s_n können mit den entsprechenden Parametern S_1 der Monomeren nach C.D. Cox, Arch. Biochem. Biophys. 129 (1969) 106–123 wie folgt abgeschätzt werden. 55

$$s_n = s_1 \cdot n^{2/3} \quad (2)$$

Die radialen Positionen der einzelnen Fraktionen als Teil der Gesamtkonzentration zur Zeit t können nach Gleichung (3) berechnet werden. 60

$$r_n = r_m \cdot e^{s_n \omega^2 t} \quad (3)$$

Die zurückgelegten Strecken in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen reduzieren sich bedingt durch den Einfluß der Viskosität (η) und Dichte (ρ) des Lösungsmittels (Gleichung (4)) um den Faktor f . 65

DE 195 49 267 A1

3. Verfahren nach Anspruch 1 + 2 zur Stabilisierung von Kristallkeimen, dadurch gekennzeichnet, daß Substanzen, die schwache "Linker"-Eigenschaften aufweisen, zugesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Pyridoxalphosphat zugesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß es für Fibrinolytika angewendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es für Plasminogen, Plasminogen-Aktivatoren, Streptokinase, Staphylokinase angewendet wird. 5
7. Verfahren nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß es für Membranproteine angewendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es für Cytochrom P450 angewendet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65